

氏名（本籍）	まつ ざか なお き 松 坂 直 樹（東京都）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲第 879 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	温度応答性培養基材のための高分子ブラシ構造の分子設計に関する研究

論文審査委員	（主査）教授 菊池 明彦
	教授 松本 睦良 教授 曾我 公平
	教授 西尾 圭史 教授 田代 文夫

## 論文内容の要旨

これまでに、医療・バイオ分野への展開を目的とした生体材料が開発されており、材料表面のぬれ性、電荷、形状、硬さなどの物理化学的性質を制御することで細胞培養技術、医薬・診断薬、生体分子・細胞解析および治療・移植技術、などに応用されてきた。その中でも、さまざまな刺激に応じて分子レベルで性質を変化させる刺激応答性高分子を用いたインテリジェント材料が近年注目されている。刺激応答性高分子は周辺環境の物理化学的刺激（温度、光、pH、生体分子など）に応答し、その性質や形状変化による体内への薬物送達システム、細胞や生理活性物質の分離技術といった応用例が報告がされている。刺激応答性高分子材料は細胞を用いた組織再構築を実現する再生医療への応用も活発に行われている。再生医療は、事故や疾患により生体組織・臓器の機能の障害、不全が生じた場合、細胞を積極的に用いて組織を再構築し、機能回復を図るものであり、生体内や培養系において、体の組織構造を再生させる組織工学(Tissue Engineering)という手法が提唱されている。本手法の一つに、生分解性高分子を組織の性質や形状に合わせて成型した細胞培養の足場として用いる方法があり、生分解性材料が分解する過程で生じる移植部位の炎症反応や、心臓もしくは肝臓といった細胞密度が高く複雑な構造を有する臓器再生は困難、などの問題がいまだに残っている。そこで、Okano らは生分解性高分子による足場を用いず、細胞からなるシート状組織を移植することで組織再生を可能とする「細胞シート工学」を提案した。細胞シート工学では温度応答性高分子を修飾した培養皿により、温度変化で細胞外

マトリックス(Extracellular matrix, ECM)を維持した状態で一面に増殖した細胞をシート状組織“細胞シート”として非侵襲的に回収することに成功し、すでに細胞シートを用いた再生医療の臨床研究が始まっている組織・臓器も存在する。

温度応答性細胞培養皿は下限臨界溶液温度(Lower critical solution temperature, LCST)を $32^{\circ}\text{C}$ に有する温度応答性高分子 poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)を電子線重合することで調製される。しかし、この方法では培養皿上にグラフトされた表面高分子層は架橋構造をもち、PNIPAAm の鎖長・密度の精密制御、高分子鎖の分子設計、温度変化にともなう細胞の接着・増殖および脱着挙動に対してグラフトした PNIPAAm 構造がどのように影響するかを議論することは困難であった。そのため、基板表面上に高分子鎖がブラシ状にグラフトされた構造を有する PNIPAAm ブラシ表面を作製可能なりビングラジカル重合(Living radical polymerization, LRP)に本研究は着目した。LRP の一種である表面開始可逆的付加-開裂連鎖移動型ラジカル重合法(Surface-initiated reversible addition-fragmentation chain transfer (SI-RAFT) radical polymerization)を用いて、鎖長、グラフト密度を精密制御した PNIPAAm ブラシ構造表面を作製することで、細胞の接着・脱着挙動に関する基礎的評価が行われてきた。SI-RAFT 重合では、高分子ブラシ構造で基板表面上にグラフトされ、その末端官能基には連鎖移動剤(Chain transfer agent, CTA)由来の機能性官能基が存在する。そのため、電子線重合法では作製できない多段階重合によるブロック共重合体ブラシ構造やポリマー鎖末端に機能性官能基を導入などの高分子ブラシの設計が可能となる。以上の背景から、本研究では、種々の高分子ブラシ構造が基板の物性、細胞の接着・増殖挙動、および細胞シート回収に与える影響について検討するために、SI-RAFT 重合を用いて温度応答性培養表面のための高分子ブラシ構造の分子設計について追求した。

第2章では、ガラス基板上に温度応答性ブロック共重合体ブラシ構造を構築することで、PNIPAAm 単層の基板と比較してブロック共重合体構造における異種のポリマー層が細胞の接着・増殖および細胞シート回収に与える影響について検討することを目的とした。高分子ブラシの生長末端には CTA 由来の官能基を有することから、多段階の重合を行い、ブロック共重合体構造の構築が可能である。本研究では、ブロック共重合体ブラシの下層となる第一段階目の重合では疎水性高分子である poly(benzyl methacrylate) (PBzMA)を SI-RAFT 重合によって導入した。次に、上層となる第二段階目の重合で PNIPAAm を同様に重合し、温度応答性ブロック共重合体ブラシ表面を作製した。各ポリマーのグラフト量を ATR/FT-IR 測定より算出した結果、第一層の PBzMA を重合する際、重合溶液中の BzMA 濃度を  $1\text{ mol/L}$  (sBz(S):  $0.28 \pm 0.02\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )または  $3\text{ mol/L}$  (sBz(L):  $0.50 \pm 0.01\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )に調節し、グラフト量が異なる PBzMA 基板を作製した。次に、PNIPAAm を CTA のみ固定化した基板と各 sBz に対して重合を行うことで、PNIPAAm 単層の表面(sIP:  $0.81 \pm 0.01\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )とブロック共重合体ブラシ表面(sBz(S)-IP:  $0.93 \pm 0.05\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , sBz(L)-IP:  $0.90 \pm 0.07\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )

において PNIPAAm のグラフト量が同等であることが示された。また、作製した基板上的の水に対する表面ぬれ性を静的接触角測定で評価したところ、すべての PNIPAAm 修飾表面では 32°C 付近を境に低温側では約 30°、高温側では約 39°となり、グラフトされた PNIPAAm が温度に応じて相転移挙動を示すことが確認された。作製した基板に、ウシ頸動脈由来血管内皮細胞(EC)を  $1.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の濃度で播種してから 37°C で培養後、sIP および sBz(S)-IP では播種後 5 日以内で EC が基板全体に増殖したが、sBz(L)-IP では播種後 7 日後も EC は基板全体に増殖しなかった。次に、EC が基板全体に増殖した sIP および sBz(S)-IP を 20°C に静置したところ、sBz(S)-IP では静置後約 20 分、sIP では約 60 分で細胞をシート状の組織として回収できることを明らかにした。この剥離速度の促進は PNIPAAm 層の下層に導入した PBzMA 層が起因している。sBz(L)-IP は sBz(S)-IP と比較して細胞の接着・増殖が抑制されていることから、PBzMA 鎖の鎖長の増加にともなって細胞および接着タンパク質と基板との相互作用が低下した。そのため、細胞シート回収において sIP と比較して sBz(S)-IP は PBzMA 層が起因して細胞シートの剥離挙動が加速したと考えられる。以上の結果から、PBzMA 層のグラフト量を調節することで、細胞の接着・増殖性を変えることなく細胞シートの剥離速度を促進させることに成功した。

第 3 章では、疎水性官能基であるドデシル基を有する CTA を用いて SI-RAFT 重合を行い、基板表面の PNIPAAm 鎖の生長末端を疎水性から親水性に置換することで、末端官能基の親・疎水性の変化が PNIPAAm 鎖の特性およびそれにとまなう細胞の接着・脱着挙動に与える影響を検討することを目的とした。PNIPAAm 鎖は水中で LCST を 32°C にもつが、PNIPAAm 鎖の末端官能基の親・疎水性によって LCST は低温または高温側にシフトすることが報告されている。本研究では、疎水性官能基であるドデシル基を有する CTA を用いて PNIPAAm の SI-RAFT 重合を行い、末端官能基がドデシル基の PNIPAAm 修飾基板(sIP-D)を作製した。次に還元反応によって末端ドデシル基をチオール基に置換し、親水性官能基であるマレイミド基を導入した PNIPAAm 修飾基板(sIP-M)を作製した。ATR/FT-IR 測定から PNIPAAm のグラフト量は sIP-D( $1.02 \pm 0.10$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )と sIP-M( $0.95 \pm 0.12$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )となり、同等の値を示した。作製した基板に対して、EC を  $5.0 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> の濃度で播種後、25~37°C の間の所定温度で 24 時間培養を行い、温度依存的な EC 接着挙動を評価した結果、sIP-D では 31°C、sIP-M では 33°C 以上で細胞の接着を確認した。続いて、各基板の水に対するぬれ性を静的接触角測定により評価した結果、sIP-D は 30°C、sIP-M は 31°C 付近を境にぬれ性の変化を示した。また、リニアな PNIPAAm の LCST と比較するために、基板上にグラフトした PNIPAAm 鎖と同等の分子量を有する片末端機能型 PNIPAAm を合成して、末端基の違いによる PNIPAAm 鎖の LCST を吸収波長 600 nm の各温度における光透過度変化を行った。その結果、PBS 中における温度変化測定において LCST は、ドデシル基末端を有する PNIPAAm が 29.0°C、マレイミド基末端を有する PNIPAAm が 29.6°C となった。こ

の結果より、各基板における水に対するぬれ性の差とリニアな PNIPAAm における LCST の差の違いは基板上の PNIPAAm 鎖のグラフト密度が影響していると考えられる。グラフト密度は、PNIPAAm 鎖の分子量とグラフト量から算出した結果、 $0.16 \text{ chains/nm}^2$  となり、高密度な状態で PNIPAAm 鎖がグラフトされている。そのため、sIP-D では密度高く修飾された PNIPAAm 鎖の末端ドデシル基同士が疎水性のクラスターを形成することで、PNIPAAm 鎖近傍の脱水和・凝集を促進する。その結果、基板上の PNIPAAm 鎖の LCST がさらに低温側にシフトすることになり、リニアな PNIPAAm 同士の LCST の差よりも各基板上におけるぬれ性変化の境目の差が拡大したと考えられる。以上より、末端官能基が疎水性のドデシル基では LCST が低温側へ、親水性のマレイミド基では高温側へシフトしたため、細胞の接着可能な開始温度に違いが生じる結果が示された。一方、細胞シートの回収を検討するため、EC が基板全体に増殖した両基板を  $20^\circ\text{C}$  に静置したところ、sIP-D では静置後約 29 分、sIP-M では約 23 分で細胞をシート状の組織として回収できることを確認した。これは、PNIPAAm 鎖の脱水和・凝集のプロセスでは末端官能基が起点となって相転移挙動が生じられ、水和・伸長のプロセスでは末端官能基に関係なく PNIPAAm 鎖が無作為に水和・伸長の相転移挙動を示すため、細胞シートの剥離挙動に違いが生じなかったと考えられる。以上の結果から、末端官能基の違いによって基板上の PNIPAAm 鎖の LCST を低温または高温側にシフトさせ、細胞の接着可能な開始温度の制御に成功した。

以上より、第 2 章では温度応答性ブロック共重合体ブラシ構造による細胞の接着・脱着挙動の制御および細胞シートの剥離速度の加速化、第 3 章では末端官能基の親・疎水性の違いによる PNIPAAm 鎖の LCST の変化を利用した細胞が接着可能な開始温度の制御に成功した。これらの結果から、SI-RAFT 重合を用いてブロック共重合体ブラシ構造や末端官能基の親・疎水性の選択といった、温度応答性培養基材のための高分子ブラシ構造の分子設計を行うことが可能となった。また、それらの高分子ブラシ構造の分子設計が PNIPAAm 鎖のグラフト鎖長・密度以外の細胞の接着・脱着挙動に対する新たな制御因子として、種々の細胞腫や共培養などの培養方法に対応した基板表面のブラシ構造を調製可能な温度応答性表面としての応用が期待される。これにより将来的に、本手法により作製した基板を用いてさまざまな細胞種を細胞シート化する際に、細胞特有の性質により基板上において細胞が接着・増殖しない、増殖してもシート状に回収することが困難な細胞、または、臓器の構造や複数種の細胞を用いてより人体を模倣した細胞シートの作製といった多種多様な細胞種の培養とその機能的な細胞シート作製への応用が考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

現在、バイオ、ライフサイエンス分野や医療分野への応用を目的に、種々バイオマテリアルが開発されており、材料のバルク物性や材料表面の物理化学的性質（ぬれ性、電荷、形状、硬さ、など）を制御した材料が研究されている。特に近年、患者の細胞を取り出し培養後、それを移植して治療に用いる再生医療に関する研究が国内外で活発に検討されている。再生医療は、事故や疾患によって生体組織や臓器の機能障害や機能不全が生じた場合に、細胞を積極的に用い培養系、または生体内で組織を再構築し、これを移植することで機能回復を図るために研究が行われている。特に、生体内分解性材料からなる多孔性マトリックスに細胞を播種・増殖させる一方、材料自体は所定期間後に分解・消失するため、生分解性材料が再生医療における細胞培養マトリックスとして検討されてきた。しかし、生分解性材料の分解する過程で、移植部位の pH 低下に伴う炎症反応が避けられないばかりか、多くは骨、軟骨の再生に有効であることが示されているものの、軟組織再生のための細胞培養マトリックスとしてはその利用が難しいことが示されている。一方、Okano らは感温性ポリマーを修飾した細胞培養皿で培養した細胞が、培養温度を 37°C から 20°C に下げると自発的に細胞が剥離し、これを再生医療に応用する研究が精力的に展開されている。しかし、Okano らの方法では、感温性ポリマーの培養皿への固定は電子線重合が用いられているため表面固定されたポリマーの鎖長と密度の制御が困難である。そこで、明確な鎖長と表面密度でポリマーを修飾する方法として、表面開始可逆的付加-開裂連鎖移動型 (SI-RAFT) ラジカル重合に着目している。この方法では、重合法の特徴から多段階重合によってブロック共重合体ブラシ構造を構築したり、ポリマー末端のジチオカーボネート基変換反応により機能性官能基の導入をしたりすることができる。そこで本研究では、SI-RAFT ラジカル重合により、機能性ポリマーブラシ修飾表面を設計し、そのポリマー構造や末端基構造の違いに基づく細胞接着制御を通じ、温度応答性培養表面のための高分子ブラシ構造の特性を明らかにすることを目的にしている。

第 1 章は序論である。序論では、研究の背景と解決すべき問題点を提示し、本論文の研究目的を記している。

第 2 章では、SI-RAFT ラジカル重合を適用し、疎水性-感温性ブロック共重合体ブラシが培養細胞の接着・脱着挙動に与える影響を明らかにすることを目的にしている。まず、ガラス基板上で疎水性ポリマー層を構築後、さらに感温性ポリマーである poly(*N*-isopropylacrylamide)(PNIPAAm)の重合を行い、疎水性-感温性ブロック共重合体ブラシを作製した。このとき PNIPAAm の重合度は一定で疎水性高分子である poly(benzyl methacrylate) (PBzMA)の重合度の異なるブロック共重合体ブラシを調製し、PBzMA 層が細胞接着・脱着に与える影響を評価している。第 1 層である PBzMA ブラシは仕込みモノマー濃度を変えて合成し、1mol/L BzMA の場合 0.28 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、3mol/L BzMA の場合 0.50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  となる表面が得られたことを示した。さらにこの表面に PNIPAAm を修飾したとそのグラフト量はそれぞれ 0.93  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、0.90  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  であり PNIPAAm の重合度はほぼ等しい表面であることを明らかにした。これらの表面でウシ頸動脈由来血管内皮細胞 (EC) を培養すると、PBzMA グラフト量の多いブロック共重合体表面では EC 細胞の接着数は PBzMA グラフト量の少ない表面に比して半分程度になり、その後培養皿一面に増殖することがないことを示した。一方、PBzMA グラフト量の少ない表面では PNIPAAm ブラシのみを修飾した表面と同様に EC 細胞が接着・増殖した。興味深いことに、培養温度を 37°C から 20°C に低下させたところ、培養 EC 細胞が表面から脱着し PNIPAAm ブラシ表面では 62 分で細胞のシート状組織が回収されたのに対し、PBzMA-*b*-PNIPAAm ブラシ表面では 21 分程度で細胞のシート状組織が回収できたことから、PBzMA ブラシ層が存在することで細胞脱着を促進することができる表面であることを見いだした。

第3章では、細胞の接着温度に与える PNIPAAm ブラシの末端官能基の影響を明らかにすることを目的に、ドデシル基を有する表面固定連鎖移動剤を修飾したガラス基板を用いて SI-RAFT ラジカル重合を行い、PNIPAAm ブラシ表面を調製した。その後連鎖移動剤由来のドデシル基をマレイミド基に変換した。上記の反応により得られた表面上で EC 細胞を培養すると、ドデシル末端を有する PNIPAAm ブラシ表面では 31°C以上の温度で、マレイミド末端を有する PNIPAAm ブラシ表面では 33°C以上の温度で EC 細胞の接着・増殖を確認した。このとき温度変化に伴う PNIPAAm 表面の水に対するぬれ性から表面の親水性・疎水性変化をする温度はそれぞれドデシル基末端で 30°C、マレイミド末端で 31°Cであり、疎水性のドデシル基が温度変化にともなう PNIPAAm ブラシの脱水和・凝集を促進し、細胞の接着開始温度が親水性のマレイミド基を末端に有する表面に比して低くなることを示した。これに対し、培養温度を 20°Cに低下させた場合、両表面からの細胞の脱着に有意な差は見られず、PNIPAAm ブラシの水和・伸長の過程で末端基の性質の違いが大きな影響を与えない可能性を示唆している。

以上、本論文は、鎖長と密度が明確な感温性ポリマーブラシ表面を調製し、これら表面における細胞接着・脱着に与えるポリマーブラシ組成の影響と、末端官能基が細胞接着開始温度に与える影響を議論し、細胞の接着・脱着を制御するポリマーブラシ構造の分子設計の重要性を示す基礎知見を述べている。よって本論文は博士（工学）の学位論文として価値のあるものと認める。